

ABSTRACT

DE 100 42 797

Novelty - An analysis chip comprising different types of molecule immobilized in specific areas, where each type of molecule has a code in an adjacent area indicating its type, is new.

Detailed Description - An INDEPENDENT CLAIM is included for a process comprising:

(a) carrying out an analysis reaction to identify different types of molecule immobilized at specific positions on an analysis chip; and (b) writing the results of the analysis on the chip.

Use - On DNA arrays and chips. **Advantage** - Analysis data is more accurately associated with the chips.

BEST AVAILABLE COPY



(10) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift

(10) DE 100 42 797 A 1

(5) Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/68
C 07 K 17/14
G 01 N 33/48
G 06 K 19/00
// C07H 21/00

(11) Anmelder:
BASF-LYNX Bioscience AG, 69120 Heidelberg, DE

(17) Vertreter:
Patentanwälte Köllner & Kewitz, 80339 München

(12) Erfinder:
Müller, Ralph, Dr., 69412 Eberbach, DE

(55) Entgegenhaltungen:
US 57 70 358 A
US 57 36 332 A

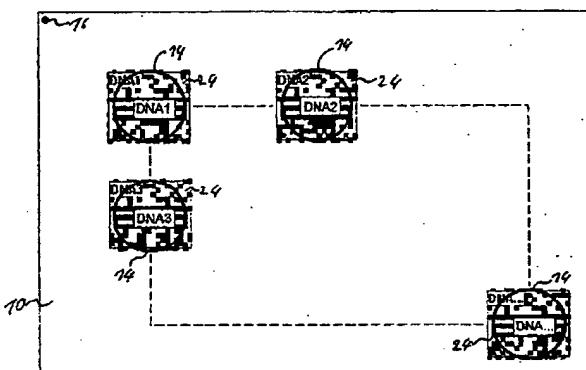
DE 100 42 797 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

(34) Analysen-Chip

(37) Beschrieben wird ein Analysen-Chip (10), z. B. ein DNA-Array, auf dem eine Vielzahl unterschiedlicher Arten von Molekülen in jeweils zugeordneten räumlichen Bereichen (14) immobilisiert sind. Jeder Art von Molekülen ist ein zugehöriger Code in einem zugehörigen räumlichen Bereich (24) auf dem Chip zugeordnet. Der Code gibt an, welche Art von Molekülen in dem jeweiligen Bereich immobilisiert ist. Der Code kann durch die Anordnung der Moleküle ausgebildet sein, etwa dadurch, dass in einem Bereich von 5 x 5 Spots nur gewisse Spots belegt werden und so ein Binärkode ausgebildet wird. Alternativ kann der Code (24) unabhängig von den immobilisierten Molekülen, z. B. als zweidimensionaler Binärkode, auf dem Chip ausgebildet sein. Da beim Auslesen des Chips mit Hilfe des jeweiligen Codes selbst ermittelt werden kann, an welche Targetmoleküle gebunden wurde und welche Moleküle somit in der Probe waren, ohne dass auf externe Informationen zurückgegriffen werden muss, wird somit die Sicherheit im Einsatz von DNA-Arrays erhöht.



DE 100 42 797 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft einen Analysen-Chip, auf dem unterschiedliche Arten von Molekülen in jeweils zugeordneten räumlichen Bereichen immobilisiert sind.

[0002] In immer mehr medizinischen und wissenschaftlichen Anwendungen werden Proben, die DNA- oder RNA-Moleküle enthalten, mit Hilfe von geeigneten DNA-Arrays qualitativ bzw. quantitativ analysiert. Bei der Analyse wird die Bindung bzw. Hybridisierung der gewonnenen DNA-Moleküle an geeignete, auf dem Array immobilisierte DNA-Fragmente, sogenannte Targets, detektiert.

[0003] Hierzu bedarf es der Herstellung geeigneter DNA-Arrays, die auch Biochips genannt werden. Diese werden idR ausgehend von Mikrotiterplatten hergestellt, die Lösungen mit geeigneten DNA-Fragmenten in den Wells enthalten. Die Wells sind kleine Vertiefungen mit einem Volumen pro Well von beispielsweise 20 µl. Jedes Well enthält ein bokal:es, speziell synthetisiertes DNA-Fragment. Zum Aufbau eines DNA-Arrays werden jeweils z. B. 220 pl Lösung aus einem Well auf eine genau definierte Position auf z. B. einem Objektträger (Slide) pipettiert. Dies wird von sog. Spotting-Robotern durchgeführt. Die pipettierten DNA-Fragmente werden anschließend auf dem Slide oder Chip oder Targetträger immobilisiert.

[0004] Danach wird die zu analysierende Probe auf den Targetträger bzw. das DNA-Array gegeben. Die Probe enthält radioaktiv oder mit Farbstoffen markierte DNA- oder RNA-Moleküle. In einer speziellen Hybridisierungskammer erfolgt bei geeigneter Temperatur die Hybridisierung. Nicht hybridisierte bzw. unspezifisch gebundene DNA oder RNA aus der zu untersuchenden Probe wird durch Spülen entfernt. Hybridisierte DNA- oder RNA-Moleküle werden entsprechend ihrer Markierung in einem Reader detektiert.

[0005] Als Nachweismöglichkeiten kommen grundsätzlich der Nachweis radioaktiver Strahlung der Probe sowie der Nachweis von Fluoreszenzsignal in Betracht. Fluoreszenzsignale können sich aus einer Fluoreszenzmarkierung der Probe oder des Targets ergeben oder durch Interkalatoren. Auch können Energietransfer oder Mechanismen der Fluoreszenzlösung zwischen Probe und Target ausgenutzt werden.

[0006] Schwierigkeiten bereitet dabei, dass derartige DNA-Arrays von Hersteller zu Hersteller unterschiedlich aufgebaut sind. Ihr genauer Aufbau hängt idR von der jeweiligen Befüllung der Mikrotiterplatten und der Anordnung der Applikatoren (Nadeln, Piezodüsen etc.) der Spotting-Roboter ab. Die unterschiedlichen DNA-Array-Formate bzw. -Designs führen leicht zu Auswertefehlern, die aufgrund von Verwechslung oder durch Auflegen falscher oder nicht korrekt angepasster Auswertemasken entstehen. Selbst bei korrekter Auswerte-Vorbereitung kann es durch fehlerhafte Analyse von Leit- oder Kontrollspots zu Auswertefehlern durch Auswertemaskenverschiebung kommen. Zu einem hohen Sicherheitsrisiko führen diese Fehler in der medizinischen Gendiagnose, welche ein Hauptanwendungsbereich der DNA-Chips darstellt.

[0007] Aufgabe der Erfindung ist es, die Analysen- und Auswerfe-Sicherheit bei der Verwendung von Arrays- und DNA-Chips zu erhöhen.

[0008] Diese Aufgabe wird erfahrungsgemäß durch einen Analysen-Chip mit den Merkmalen der Ansprüche 1 oder 16, durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 17, durch eine Vorrichtung mit den Merkmalen des Anspruch 18 sowie durch ein Computerprogramm mit den Merkmalen der Ansprüche 19 oder 20 gelöst.

[0009] Erfahrungsgemäß wird ein Analysen-Chip verwendet, auf dem unterschiedliche Arten von Molekülen in je-

weils zugeordneten räumlichen Bereichen immobilisiert sind. Typischerweise handelt es sich dabei um DNA-Arrays. Die immobilisierten Moleküle sind dann z. B. eindeutig ein Gen identifizierende Genabschnitte oder Oligonukleotide.

5 Es können aber auch Antikörper-, Protein-, Allergen-Arrays etc. oder nichtpeptidische chemische Substanzbibliotheken sein. Die Analysen-Chips dienen idR zum Nachweis von Bindungsreaktionen. Es ist aber auch der Nachweis einer enzymatischen Aktivität möglich.

10 [0010] Der einer Art von Molekülen zugeordnete räumliche Bereich ist idR ein Rechteck oder ein Kreis, wie er bei Spottingverfahren entsteht. Durch mehrere Spots eines Targets innerhalb eines Bereichs kann der Bereich aber auch linear oder nach einem vorgegebenen Schema über den ganzen

15 Analysen-Chip verteilt sein, um Ungleichmäßigkeiten in der Hybridisierung auszugleichen oder ausfindig zu machen und um eine Redundanz der Hybridisierungsreaktion zu erzeugen, die die Sicherheit der Markieranalyse erhöht.

[0011] Erfahrungsgemäß wird für jede Art von Molekülen ein zugehöriger Code in einem zugehörigen räumlichen Bereich auf dem Analysen-Chip ausgebildet, wobei der Code angibt, welche Art von Molekülen in dem jeweiligen Bereich immobilisiert ist.

[0012] Jeder Art von Molekülen ist einerseits ein räumlicher Bereich zugeordnet, in dem diese Moleküle immobilisiert sind. Andererseits ist jeder Art von Molekülen ein Code zugeordnet. Zu jedem Code gehört wiederum ein räumlicher Bereich auf dem Analysen-Chip, in dem er ausgebildet ist. Dieser zugehörige räumliche Bereich kann mit dem räumlichen Bereich identisch sein, in dem die Moleküle immobilisiert sind. Er kann aber auch diesem räumlichen Bereich benachbart sein oder dem Immobilisierungsbereich nach einem festen Schema zugeordnet sein.

[0013] Bei einer Nachweisreaktion kann gleichzeitig der Code ausgelesen werden und somit festgestellt werden, an welche Art von Molekülen die Probe gebunden hat. Es bedarf dann keiner array-spezifischer Angaben mehr über die Art und Anordnung der Moleküle auf einem Beiblatt oder in einer begleitenden Software. Eine Verwechslung verschiedener Arten von Molekülen ist damit ausgeschlossen. Die Sicherheit in der Handhabung, Auswertung und Diagnose ist dadurch wesentlich erhöht.

[0014] In einer bevorzugten Weiterbildung der Erfindung ist der Code durch die Anordnung der Moleküle selbst in dem zugehörigen räumlichen Bereich ausgebildet. Auf diese Weise können in nur einem Schritt das Reaktionsergebnis und der Code ausgelesen werden.

[0015] Besonders einfach kann dies dadurch erfolgen, dass jeder einer vorgegebenen Art von Molekülen zugeordnete räumliche Bereich auf dem Analysen-Chip in eine Mehrzahl von Spots unterteilt ist, und dass der Code ein Binärkode ist, der dadurch erzeugt wird, dass in einigen dieser Spots Moleküle immobilisiert sind und in den verbleibenden Spots nicht.

[0016] Der Binärkode kann beispielsweise dadurch kodiert sein, dass einem immobilisierten Spot eine 1 und einem freien Spot eine Null entspricht, oder umgekehrt. In einer etwa auf dem Internet allgemein zugänglichen Datenbanken kann erklärt werden, wie die einzelnen Codes den immobilisierten Molekülarten zugeordnet werden.

[0017] Im Nebeneffekt erhält man eine Redundanz der Hybridisierungsreaktion, da es für jede Art von Molekülen mehr als einem Spot gibt. Eine solche Art der Redundanz kann als "interne" Redundanz bezeichnet werden. Von "externer" Redundanz wird gesprochen, wenn einer Molekülart mehr als ein Code zugeordnet ist, so dass der Code der Molekülart unter Umständen noch erkannt werden kann, wenn ein Spot z. B. wegen technischer Unzulänglichkeiten kein

vollständiges Hybridisierungssignal liefert, obwohl dies zu erwarten gewesen wäre. Die Codes können für die externe Redundanz hinsichtlich Fehlertoleranz optimiert gewählt werden. Im einfachsten Fall wird dies dadurch erreicht, dass mehr Bits pro Code verwendet werden, als minimal nötig wären, etwa 4 statt 3. Der Molekülart werden dann sowohl der 4-Bit-Code, als auch alle 3-Bit-Codes zugeordnet, die sich ergeben, wenn ein Spot bzw. Bit nicht erkannt werden kann.

[0018] Alternativ dazu kann der Code unabhängig von den immobilisierten Molekülen auf dem Analysen-Chip ausgebildet sein. Der Code kann dann mit üblichen Mitteln, etwa einem Laserschreiber wie bspw. nach dem CD-Brennerprinzip oder einem hochauflösenden Printer erzeugt werden.

[0019] Beispielsweise kann der Code auf der Unterseite des Analysen-Chips angeordnet sein. Für eine Nachweisreaktion wird in diesem Fall zunächst der Code auf der Unterseite des Analysen-Chips in einem den Molekülpots eindeutig zugeordneten Bereich, z. B. der gleichen räumlichen Position, gelesen. Anschließend wird der Analysen-Chip umgedreht und das Hybridisierungssignal, beispielsweise ein Fluoreszenzsignal oder radioaktive Strahlung wird ausgelesen. Im folgenden konzentrieren sich die Beispiele auf Fluoreszenzsignale allgemeiner Art.

[0020] Bei transparenten Trägern, wie Glas oder Kunststofffolien, können Code und Fluoreszenz gleichzeitig ausgelesen werden.

[0021] Weiterhin können Code und Spots auf der gleichen Trägerseite aufgebracht werden, wobei Targetspots und Code sich im gleichen räumlichen Bereich befinden und die oder der Targetspot(s) auf den Codebereich aufgebracht werden.

[0022] Schließlich kann der Code zwischen den Spots ausgebildet werden, etwa in den Lücken zwischen kreisförmigen Spots. In einem solchen Falle muss jeweils nur ein einziger Spot pro Molekülart aufgebaut werden. Der Code kann mit gängigen technischen Mitteln, wie Laserbeschriften oder Microspotting (Piezo, Pin, Imprint etc.) aufgebracht werden.

[0023] Bevorzugterweise wird der Code in Form eines zweidimensionalen Barcodes ausgebildet. Dieser kann sich an gängigen Standards orientieren, etwa dem Symbol Typ C aus dem Code One des Unternehmens Axtel, Inc., Fountain Valley, CA 92708, USA, www.Axtel.com, der 64 alphanumerische Zeichen codieren kann.

[0024] Der Code könnte dann eine alphanumerische Zeichenfolge codieren, die den Namen der jeweils immobilisierten Art von Molekülen darstellt, z. B. die Annotation des Gens, wie er in einer öffentlich zugänglichen Datenbank definiert ist. Es bräuchte dann nicht mehr in einer etwa auf dem Internet allgemein zugänglichen Datenbank erklärt zu werden, wie die einzelnen Codes den immobilisierten Molekülarten zugeordnet werden. Hinreichend wäre in einem solchen Falle der einfache Hinweis auf Code One Typ C von Axtel auf dem Chip, verbunden mit einem Hinweis auf die Datenbank, in der sich die Sequenzen der Gene mit der jeweiligen Annotation finden.

[0025] Generell könnte zu jedem globalen Datenbankeintrag (z. B. in der EMBL-Datenbank) auch ein standardisierter Array-Code abgelegt werden, der die eindeutige und sichere Zuordnung von Molekülarten auf allen zwei- bzw. mehrdimensionalen Ablageformaten erlaubt.

[0026] Um die Sicherheit des Auslesens weiter zu erhöhen, könnten auf dem Analysen-Chip zusätzlich Positionsmarken ausgebildet sein. Diese können z. B. durch einen der Bereiche mit einer Mehrzahl von Spots gebildet werden, wobei jeder Spot immobilisierte Moleküle trägt, während in

den Bereichen mit Molekülen, die für die Bindungsreaktion verwendet werden, nicht alle Spots belegt sind. Denn auf letzteren ist ein Code ausgebildet, der aus belegten und unbelegten Spots besteht.

[0027] Z. B. könnten grundsätzlich auf einem Bereich von 5×5 Spots nur 5 Spots als Code mit immobilisierten Molekülen belegt sein, d. h. nur 5 Bits "gesetzt" sein. Das ergibt insgesamt (25 über 5) Codierungsmöglichkeiten, das sind 53130. Die Positionsmarken könnten sich hingegen dadurch auszeichnen, dass alle 25 Spots belegt sind und zusätzlich als Grundmuster für den Auswerteargorithmus dienen. Allgemein sollen insgesamt so wenig Positionsmarken wie möglich aufgebracht werden, da durch diese nicht zu vernachlässigend viel Spottingfläche beansprucht wird.

[0028] Bei den heute üblichen Array-Chips sind sehr viele Positionsmarken für ein halbwegs sicheres Auslesen vonnöten.

[0029] Dagegen ermöglicht bereits eine Positionsmarke bei einem einen erfundengemäßen Code tragenden Chip eine genaue räumliche Orientierung des Analysen-Chips.

[0030] Ferner können die Codes derart gewählt werden, dass bei einer Auswertemasken-Verschiebung des Auslesens um eine Zeile oder Spalte kein sinnvoller Code mehr erkannt wird. Einerseits erhöht dies die Sicherheit gegen falsches Auslesen im Falle von Verschiebungen. Andererseits kann so auch erkannt werden, dass hier wohl eine Maskenverschiebung vorliegt.

[0031] Sinnvollerweise wird der Code hierarchisch aufgebaut. Beispielsweise kann der Code aus einem ersten Teil bestehen, der den Organismus beschreibt aus dem ein Gen stammt, während ein zweiter Teil des Codes das Gen selbst benennt. Auf diese Weise können Analysen-Chips aufgebaut werden, die etwa sämtliche Gene des Menschen bzw. sämtliche Gene der Maus oder eines anderen Organismus jeweils tragen.

[0032] Der hierarchische Code kann aus einem ersten und einem zweiten Teil bestehen. Der erste Teil des hierarchischen Codes kann beispielsweise in den Positionsmarken angeordnet sein, während der zweite Teil in den jeweiligen Bereichen der immobilisierten Moleküle angeordnet ist. Dabei sollte sich die Art der Codierung des zweiten Teils des Codes in den jeweiligen Bereichen und die Art der Codierung des ersten Teils des Codes in den Positionsmarken eindeutig voneinander unterscheiden, damit die Positionsmarken noch als solche erkannt werden können.

[0033] Z. B. könnten für die Codierung der Annotation eines Gens 5 Bits aus $5 \times 5 = 25$ gesetzt sein, während für den Organismus, aus dem das Gen stammt, 5 Bits aus $5 \times 5 = 25$ nicht gesetzt sind, d. h. 20 Bits gesetzt sind. Auf diese Weise lässt sich eine universale Architektur für DNA-Arrays für Gentests aufbauen.

[0034] In einer Weiterbildung der Erfindung kann innerhalb eines räumlichen Bereichs, der einer ersten Art von Molekülen zugeordnet ist, zusätzlich eine zweite Art von Molekülen immobilisiert sein. Für beide Arten von Molekülen kann jeweils der zugehörige Code durch die Anordnung der Moleküle innerhalb des einen räumlichen Bereichs ausgebildet sein.

[0035] Wird beispielsweise ein Bereich von 10×10 Slots (das sind Platzhalter für Spots) gebildet, von denen nur 3 Bits gesetzt sind (entsprechend $(100 \text{ über } 3) = 161700$ Codierungsmöglichkeiten), so blieben noch 97 Slots frei. Die restlichen 97 Slots können noch genutzt werden, um Platz zu sparen und so den Analysen-Chip besser auszunutzen. Das Auslesen einer Bindungsreaktion kann dann beispielsweise über zwei unterschiedlich gefärbte DNA-Fragmenten in der Probe erfolgen.

[0036] Bei einer derartigen mehrfachen Belegung eines

Bereichs sollte vermieden werden, dass zwei Arten von Molekülen auf ein und denselben Slot immobilisiert werden, da eine solche Doppelbelegung zu Schwierigkeiten beim Auslesen von Fluoreszenzsignalen führen kann. Vermieden werden kann dies durch eine geeignete Auswahl der Arten von Molekülen bzw. der Codes. Im einfachsten Fall liegt ein Code in einer räumlichen Hälfte des Bereichs und der zweite Code im verbleibenden Teil des Bereichs. Insgesamt können die Molekülarten und Codes derart gewählt werden, dass mehr als zwei Arten von Molekülen in einem Bereich immobilisiert sein können. Man kann hier von einer Auswahl für eine maximale Packungsdichte sprechen, die bei der Herstellung eines Analysen-Chips von einem Sortieralgorithmus übernommen werden könnte.

[0037] Eine Mehrfachbelegung eines einzigen Slots ist dann möglich, wenn die unterschiedlichen Arten von immobilisierten Molekülen innerhalb eines einzigen räumlichen Bereichs unterschiedlich gefärbt sind. Beim Auslesen des Analysen-Chips können dann die unterschiedlichen Farben erkannt werden. Gibt man eine markierte Probe zu, so erhält man bei der Hybridisierung auf allen Spots, die zu einem bestimmten Code gehören, sowohl die Farbe des Targets als auch die Farbe der gebundenen Probe. Allgemeinen können jegliche Formen von spektroskopischen Charakteristika innerhalb eines Spots zum Identifizieren ausgenutzt werden. Denkbar ist auch ein Energietransfer oder eine Fluoreszenzlösung zwischen Target und Probe.

[0038] Eine weitere Möglichkeit, Slots mehrfach zu belegen, kann dadurch erreicht werden, dass die zu einer Molekülart gehörenden Spots mit einem vorgegebenen räumlichen Muster ausgebildet sind. So kann der Spot für die einzelnen Arten von Targetmolekülen beispielsweise in Form eines Pfeils, Eies oder Exziters ausgebildet sein, d. h. einem Objekt, das eine Vorzugsrichtung aufweist, das je nach Molekülart unterschiedlich orientiert ist. Derartige Muster können besonders einfach dann aufgebracht werden, wenn die Übertragung des Targets auf den Analysen-Chip mittels Stempeln erfolgt, die außerdem drehbar sind. Räumliche Muster kann man beispielsweise auch erhalten, wenn man einen kleinen Kreis und einen großen Kreis teilweise überlappend spotte. Auch in diesem Fall wird man die zu einem bestimmten Code gehörigen Spots daran erkennen können, dass sie das gleiche räumliche Muster aufweisen.

[0039] Auch ein kombinierter Einsatz von Farbe und Form zum Identifizieren von Codes ist denkbar.

[0040] Eine weitere effiziente Ausnutzung des Raumes innerhalb eines Bereichs kann dadurch erreicht werden, dass der Abstand der Spots einer ersten Molekülart innerhalb des einen Bereichs und der Abstand der Spots einer zweiten Molekülart innerhalb desselben Bereichs sich unterscheiden. So kann der Abstand von Spot zu Spot (Pitch) für die erste Molekülart beispielsweise 100 µm und für die zweite Molekülart 98 µm betragen, nach Art eines Nonius. Eine derartige Verschiebung ist leicht zu erkennen. So kann jeder Molekülart ein bestimmter Pitch zugeordnet werden.

[0041] Durch eine geeignete Auswertung der Auslesesignale kann auch ein Überlappen der Spots einzelner Molekülarten hingenommen werden, wie sie sich durch den unterschiedlichen Pitch leicht ergeben kann. Generell kann durch definierte Überlappung der Spots auch die Spotdichte erhöht werden.

[0042] Die verschiedenen erwähnten Möglichkeiten des mehrfachen Ausnutzens eines Bereichs können alle miteinander kombiniert werden.

[0043] Die Sicherheit in der Verwendung von Analysen-Chips kann auch dadurch erhöht werden, dass nach Auslesen einer Nachweisreaktion auf dem Analysen-Chip das Ergebnis der Nachweisreaktion auf den Analysen-Chip ge-

schrieben wird. Auf diese Weise bleiben Informationen, etwa ein Befund für medizinische Zwecke, erhalten, selbst wenn beispielsweise die DNA auf dem Chip degradieren sollte. Der Analysen-Chip kann dem Patienten dann schlicht

5 mitgegeben werden. Der Analysen-Chip kann dabei auch eine der erwähnten Arten der Codierung tragen. Das Schreiben des Analysen-Ergebnisses in definierter Codeform auf den Analysen-Chip kann mit üblichen Mitteln erfolgen, beispielsweise mittels eines Lasers, eines Tintenstrahls, eines

10 Laserdruckers, oder sonstiger Beschriftungsverfahren. Die Information sollte möglichst permanent lesbar sein.

[0044] Weitere vorteilhafte Weiterbildungen der Erfindung sind in den Unteransprüchen gekennzeichnet.

[0045] Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert, die in den Figuren schematisch dargestellt sind. Gleiche Bezugsziffern in den einzelnen Figuren bezeichnen dabei gleiche Elemente. Im einzelnen zeigt:

[0046] Fig. 1A den schematischen Aufbau eines bevorzugten DNA-Arrays;

[0047] Fig. 1B eine Auswertung des DNA-Arrays gemäß Fig. 1A;

[0048] Fig. 2A den schematischen Aufbau eines alternativen DNA-Arrays;

[0049] Fig. 2B den schematischen Aufbau eines weiteren alternativen DNA-Arrays;

[0050] Fig. 3 Möglichkeiten der räumlichen Codierung;

[0051] Fig. 4 einen Bereich mit Spots von unterschiedlichem Pitch; und

[0052] Fig. 5 eine schematische Darstellung eines Analysen-Chips, auf den das Ergebnis einer Nachweisreaktion geschrieben werden kann.

[0053] Fig. 1A zeigt einen DNA-Chip 10 mit auf einem rechteckigen Raster angeordneten Bereichen 12. Innerhalb eines jeden Bereichs 12 befindet sich ein Raster von Spots 14, auf denen Oligonukleotide immobilisiert sind. An den äußersten Ecken des Chips befinden sich Positionsmarken 16, die dadurch zu erkennen sind, dass innerhalb ihrer Bereiche alle Spots 14 belegt sind. In einer der Positionsmarken 18, die auf Grund ihrer räumlichen Lage als Positionsmarke zu erkennen ist, sind nicht alle Spots belegt. Vielmehr weist diese Positionsmarke 18 einen Code für das Wort "Human" auf. Es handelt sich bei dem DNA-Chip 10 somit um einen Chip für einen Gentest am Menschen.

[0054] Der Code in der Positionsmarke 18 kann beispielsweise aufgebaut werden, indem im einfachsten Falle Farbstoffmoleküle auf einzelnen Spots immobilisiert werden, was einem gesetzten Bit entspricht, während andere Spots freigelassen werden. Außer Farbstoffmolekülen können 50 auch doppelsträngige DNA-Moleküle immobilisiert werden, die mittels Interkalatoren nachgewiesen werden.

[0055] Im Zentrum des DNA-Chips 10 befindet sich ein Bereich 20, der einen Code für die Annotation eines ersten Gens aufweist, z. B. "actin", d. h. hier sind Oligo- bzw. Polynukleotide immobilisiert, die eindeutig repräsentativ für dasjenige Gen sind, das beim Menschen das Protein ACTIN codiert.

[0056] In einem zweiten Bereich 22 ist ein Code für ein zweites Gen durch Immobilisieren der zugehörigen Oligo- 60 Polynukleotide erzeugt worden. Auf diese Weise kann in den einzelnen Bereichen des DNA-Arrays jeweils ein Gen codiert sein. Bei Uneindeutigkeit der Gene können weitergehende Informationen wie Splice- und Mutationsvarianten, Polymorphismen, Sequenzbereiche und -längen etc. ebenfalls kodiert werden.

[0057] Fig. 1B zeigt den Analysen-Chip gemäß Fig. 1A, wie er nach Auslesen durch einen Fluoreszenzreader und Auswerfen an einem Bildschirm dargestellt werden kann.

Alle Bereiche 16, 18, 20, 22 sind in ihrer Lage erkannt und durch Rechtecke markiert. Bereiche 22, in denen keine Hybridisierungssignale erkannt werden konnten, sind durchgestrichen. Bereiche 22, in denen zwar Hybridisierungssignale, aber kein Code erkannt werden konnten, sind z. B. mit einem durchgestrichenen Vollkreis gekennzeichnet. Bereiche 20, in denen ein Code erkannt wurde, sind mit dem erkannten Code bzw. der Information beschriftet.

[0058] Fig. 2A zeigt den schematischen Aufbau eines alternativen DNA-Arrays 10, bei dem der Code unabhängig von den in Spots 14 immobilisierten Molekülen in solchen Bereichen 24 des DNA-Arrays 10 ausgebildet ist, die in den Lücken zwischen den im wesentlichen kreisförmigen Spots 14 liegen. Für jede Molekülart braucht dann nur ein Spot gesetzt zu werden, der außerdem relativ groß sein kann. Zur Erhöhung der Auslesesicherheit weist das DNA-Array 10 eine Positionsmarke 16 auf.

[0059] Fig. 2B zeigt als bevorzugtes Ausführungsbeispiel eine Variante des DNA-Arrays gemäß Fig. 2A, bei der die Oligonukleotide direkt über dem zweidimensionalen Barcode immobilisiert sind. Da eine dünne Schicht von Oligo/Polynukleotiden im wesentlichen transparent ist, kann der Code auch durch die DNA bzw. Proteine hindurch ohne Schwierigkeiten gelesen werden.

[0060] In den Fig. 2A und 2B wird der Code in Form eines zweidimensionalen Barcodes ausgebildet. Als Standard für den Code wird im bevorzugten Ausführungsbeispiel der Symbol Typ A aus dem Code One des Unternehmens Axtel, Inc., Fountain Valley, CA 92708, USA, www.Axtel.com, verwendet. Dieser Standard erlaubt die Codierung von 13 alphanumerischen Zeichen auf 18 × 16 Feldern. Symbol Typ C, eine andere Variante, kann 64 alphanumerische Zeichen auf 28 × 32 Feldern codieren. Diese Codes sind u. a. fehlerkorrigierend, was die Lesesicherheit weiter erhöht.

[0061] Bei einer Spotgröße im Code von ca. 5 µm, der Codegröße des Symboltyps A von 18 × 16 Spots und der daraus resultierenden geringen Größe der Codebereiche von ca. 100 µm Kantenlänge kann auf einem einzelnen DNA-Chip von ca. 10 cm² Größe das gesamte menschliche Genom mit seinen fast 100.000 Genen für einen Test zur Verfügung gestellt werden.

[0062] Wird nicht Code One Symboltyp A verwendet, sondern ein einfacher Binärkode zum Bezeichnen der ca. 100.000 menschlichen Gene, so werden weniger als 20 Bits benötigt. Ein Bereich von 4 × 5 Spots ist somit völlig ausreichend. Um das gesamte Genom auf einem Chip von 10 cm² abzulegen reichen dann Spotgrößen von ca. 20 µm.

[0063] Möchte man nicht das gesamte Genom ablegen, sondern nur ausgewählte Gene, so können die Spots deutlich größer sein.

[0064] Fig. 3A zeigt eine Möglichkeit, die zu einer Molekülart gehörenden Spots mit einem vorgegebenen räumlichen Muster auszubilden, hier durch einen Pfeil 26 für ein erstes Gen, einen Pfeil 28 für ein zweites Gen, etc.

[0065] Fig. 3B zeigt eine weitere Möglichkeiten der räumlichen Codierung.

[0066] In diesem Ausführungsbeispiel werden zwei im wesentlichen gleich große Kreise in unterschiedlichen räumlichen Anordnungen nebeneinander gespottet, woraus sich räumliche Muster 26', 28', etc. für verschiedene Gene ergeben.

[0067] Fig. 3C zeigt die Muster gemäß Fig. 3B, wenn einige von ihnen übereinander gespottet werde.

[0068] Fig. 3D zeigt eine weitere Möglichkeiten der räumlichen Codierung.

[0069] In diesem Ausführungsbeispiel werden räumlich unterschiedlich orientierte Exzenter im wesentlichen übereinander gespottet, woraus sich räumliche Muster 26'', 28'', etc.

etc. für verschiedene Gene ergeben. Der große Kreis in der Mitte enthält dabei immobilisierte Moleküle für alle Gene.

[0070] Fig. 4 zeigt eine weitere effiziente Ausnutzung des Raums innerhalb eines Bereichs. Der Abstand (Pitch) X1 der Spots 30 einer ersten Molekülart innerhalb des Bereichs und der Abstand X2 der Spots 32 einer zweiten Molekülart innerhalb des Bereichs unterscheiden sich in zwei Dimensionen geringfügig. So kann der Abstand X1 beispielsweise 100 µm und der Abstand X2 98 µm betragen, nach Art eines Nonius. Eine derartige Verschiebung ist leicht zu erkennen. So kann jeder Molekülart ein bestimmter zweidimensionaler Pitch zugeordnet werden. Werden nur wenige Bits innerhalb eines Bereichs gesetzt, d. h. nur wenige Spots für einen Code belegt, so ist die Wahrscheinlichkeit, dass zwei belegte Spots sich überlappen, relativ gering. Ein Gen-Sortieralgorithmus kann hier die größtmögliche Packungsdichte bei höchster Nachweissicherheit gewährleisten.

[0071] Fig. 5 zeigt ein DNA-Array 34, auf das nach Auslesen einer Nachweisreaktion das Ergebnis der Nachweisreaktion geschrieben werden kann. Dazu zeigt das DNA-Array 34 einen Abschnitt 36, in dem das Ergebnis mit gängigen Mitteln geschrieben werden kann. Ferner zeigt das DNA-Array 34 einen Abschnitt 38, in dem Targetmoleküle immobilisiert sind. Welche Moleküle in den einzelnen Bereichen 25 des Abschnitts 38 jeweils immobilisiert sind, wird durch einen Code angegeben, der durch das räumliche Immobilisierungsmuster dargestellt wird. Wie der Code zu lesen ist, ist in einem dritten Abschnitt 42 auf dem DNA-Array 34 angegeben. Im vorliegenden Fall ist angegeben, dass Code Alpha Verwendung findet. Code Alpha ist an anderer Stelle, etwa auf dem Internet näher zu erklären. Im Übrigen entspricht Fig. 5 der Fig. 1B.

[0072] Im Rahmen der Erfindung sind zahlreiche Abwandlungen und Weiterbildungen der beschriebenen Ausführungsbeispiele verwirklichbar.

[0073] Das Speichern des Codes in einem zugehörigen räumlichen Bereich kann auf der Oberfläche des Chips erfolgen oder im Innern des Chips, beispielsweise in einem elektronischen Speicherchip, der über ein Kontaktfeld wie 40 bei einer Telefonkarte ausgelesen werden kann. Allgemein können sämtliche Speichermedien zum Einsatz kommen, solange sie sich in oder auf dem Chip selbst befinden, z. B. auch ein Magnetstreifen auf dem Chip.

[0074] Auch das Schreiben von Ergebnissen einer Nachweisreaktion kann in einen solchen elektronischen oder sonstigen Speicher auf oder in dem Chip erfolgen.

Bezugszeichenliste

- 50 10 DNA-Chip
- 12 Bereich, in dem eine Molekülart in mehreren Spots immobilisiert ist
- 14 Spot
- 16 Positionsmarke
- 18 Positionsmarke, in der der Organismus codiert ist
- 20 Bereich, der einen zweidimensionalen Barcode für die Annotation eines ersten Gens aufweist
- 22 Bereich, der einen zweidimensionalen Barcode für die Annotation eines zweiten Gens aufweist
- 24 Bereich für Code, der unabhängig von den immobilisierten Molekülen ausgebildet ist
- 26 Pfeil
- 26', 26'' räumliches Muster
- 28 Pfeil
- 28', 28'' räumliches Muster
- 30 Spot einer ersten Molekülart
- X1 Abstand zwischen Spots 30 einer ersten Molekülart
- 32 Spot einer zweiten Molekülart

X2 Abstand zwischen Spots 32 einer zweiten Molekülart
 34 DNA-Array
 36 Abschnitt, in den das Ergebnis einer Nachweisreaktion
 geschrieben werden kann
 38 Abschnitt, in dem Targetmoleküle immobilisiert sind
 40 Bereich, in dem eine Molekülart in mehreren Spots im-
 mobilisiert ist
 42 Abschnitt, der den verwendeten Code angibt

Patentansprüche

dass innerhalb eines räumlichen Bereichs (20, 22, 40),
 der einer ersten Art von Molekülen zugeordnet ist, zu-
 sätzlich eine zweite Art von Molekülen immobilisiert
 ist; und

dass für beide Arten von Molekülen jeweils der zuge-
 hörige Code durch die Anordnung der Moleküle inner-
 halb des einen räumlichen Bereichs ausgebildet ist.

12. Analysen-Chip nach Anspruch 11, dadurch ge-
 kennzeichnet, dass die Arten von Molekülen bzw. die
 Codes derart ausgewählt sind, dass nicht beide Arten
 von Molekülen auf einem gemeinsamen Spot (14) im-
 mobilisiert sind.

13. Analysen-Chip nach Anspruch 11, dadurch ge-
 kennzeichnet, dass die unterschiedlichen Arten von im-
 mobilisierten Molekülen innerhalb eines einzigen
 räumlichen Bereichs (20, 22, 40) unterschiedlich ge-
 färbt sind.

14. Analysen-Chip nach Anspruch 11 oder 13, da-
 durch gekennzeichnet, dass die zu einer Molekülart ge-
 hörenden Spots (14) mit einem vorgegebenen räumli-
 chen Muster (26, 26', 28, 28') ausgebildet sind.

15. Analysen-Chip nach einem der Ansprüche 11 bis
 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand (X1) der
 Spots (30) der ersten Molekülart innerhalb des einen
 Bereichs und der Abstand (X2) der Spots (32) der
 zweiten Molekülart innerhalb des Bereichs sich unter-
 scheiden.

16. Analysen-Chip, auf dem unterschiedliche Arten
 von Molekülen in jeweils zugeordneten räumlichen
 Bereichen immobilisiert sind, dadurch gekennzeichnet,
 dass nach Auslesen einer Nachweisreaktion auf dem
 Analysen-Chip das Ergebnis der Nachweisreaktion auf
 den Analysen-Chip schreibbar ist.

17. Verfahren mit folgenden Schritten:
 Mittels eines Analysen-Chips, auf dem unterschiedli-
 che Arten von Molekülen in jeweils zugeordneten
 räumlichen Bereichen (40) immobilisiert sind, wird
 eine Nachweisreaktion durchgeführt.

Nach Auslesen der Nachweisreaktion wird das Ergeb-
 nis der Nachweisreaktion auf den Analysen-Chip ge-
 schrieben.

18. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens
 nach Anspruch 17.

19. Computerprogramm, das die für einen Analysen-
 chip nach Anspruch 4 benötigten Codes erzeugt.

20. Computerprogramm, das die für einen Analysen-
 chip nach Anspruch 12 benötigten Codes erzeugt.

Hierzu 7 Seite(n) Zeichnungen

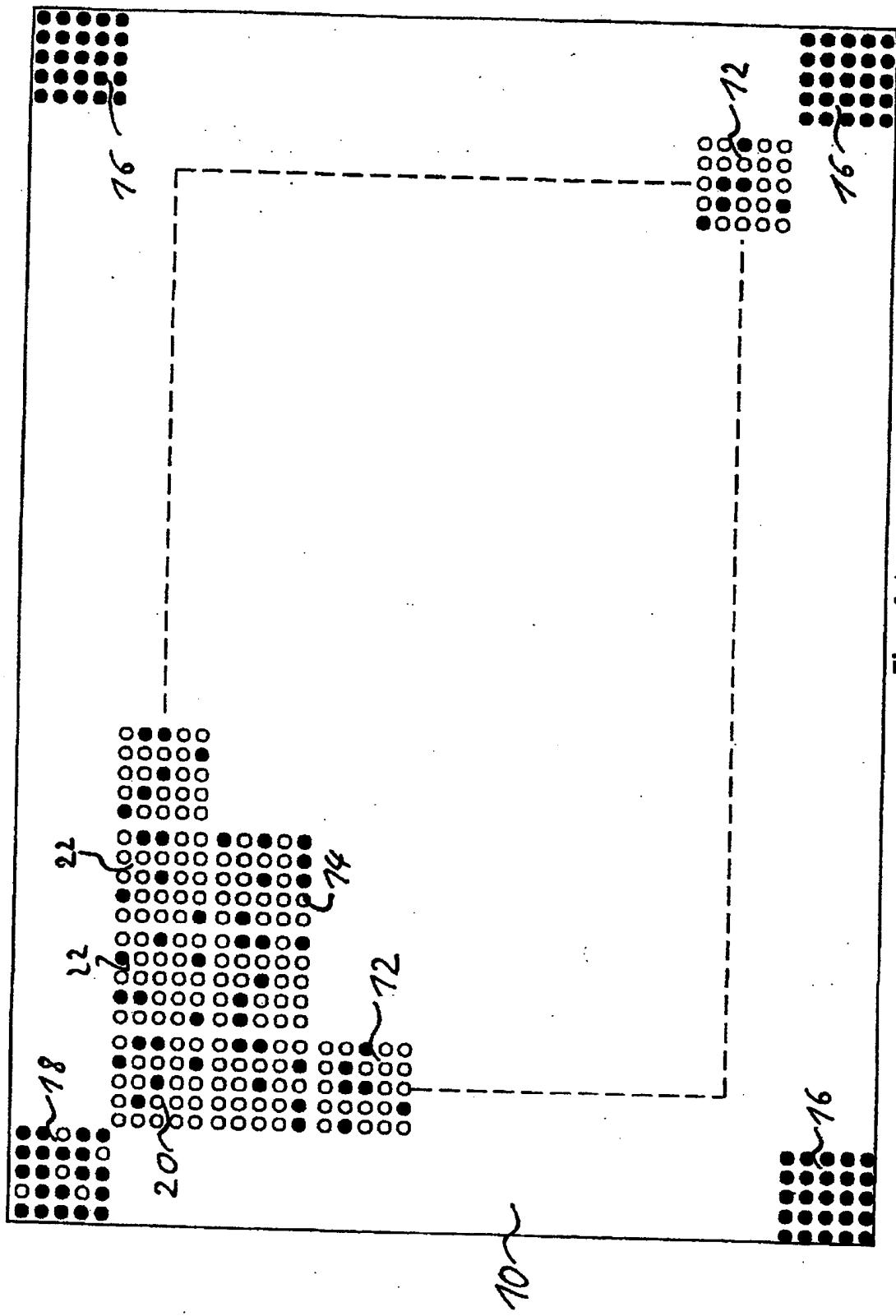


Fig. 1A

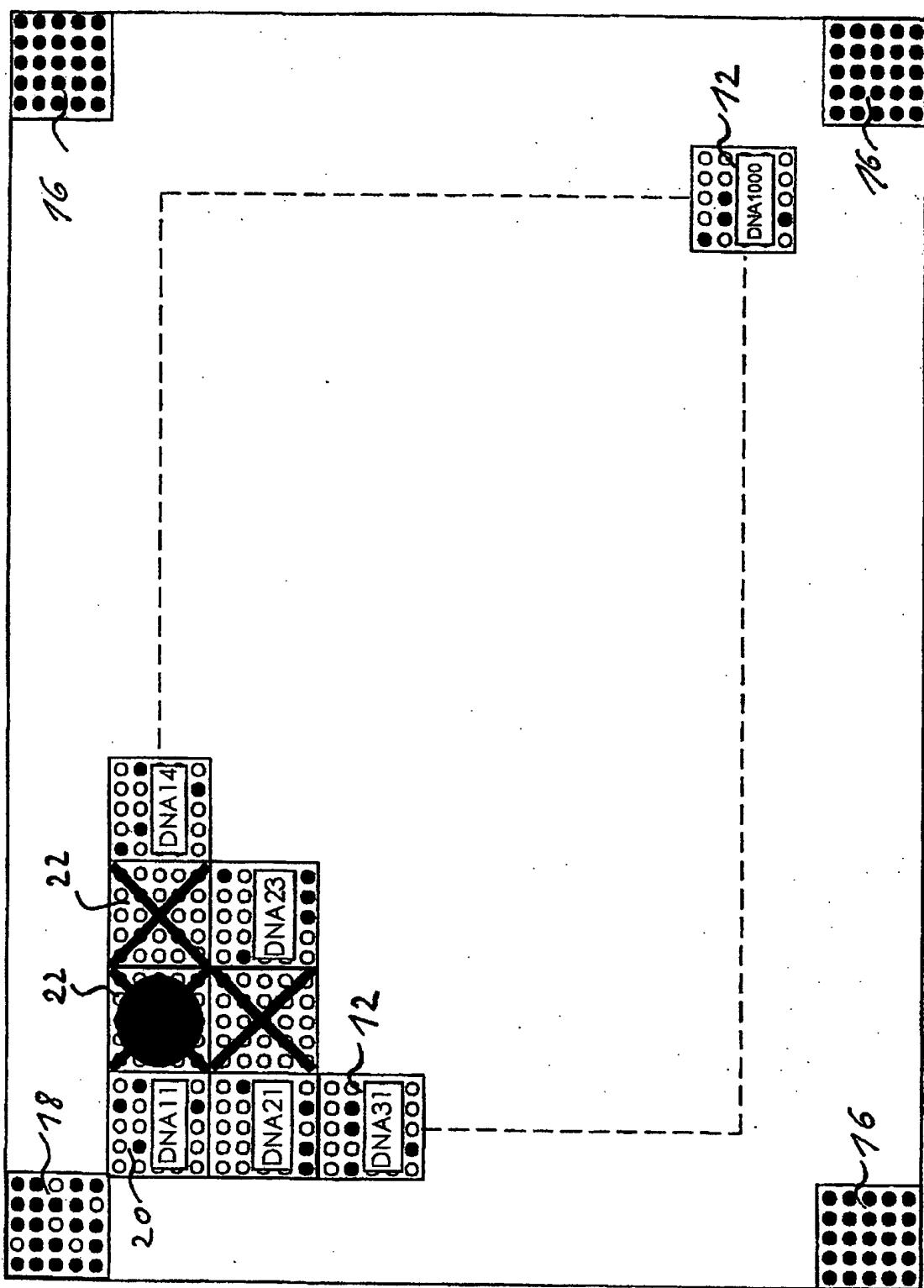


Fig. 1B

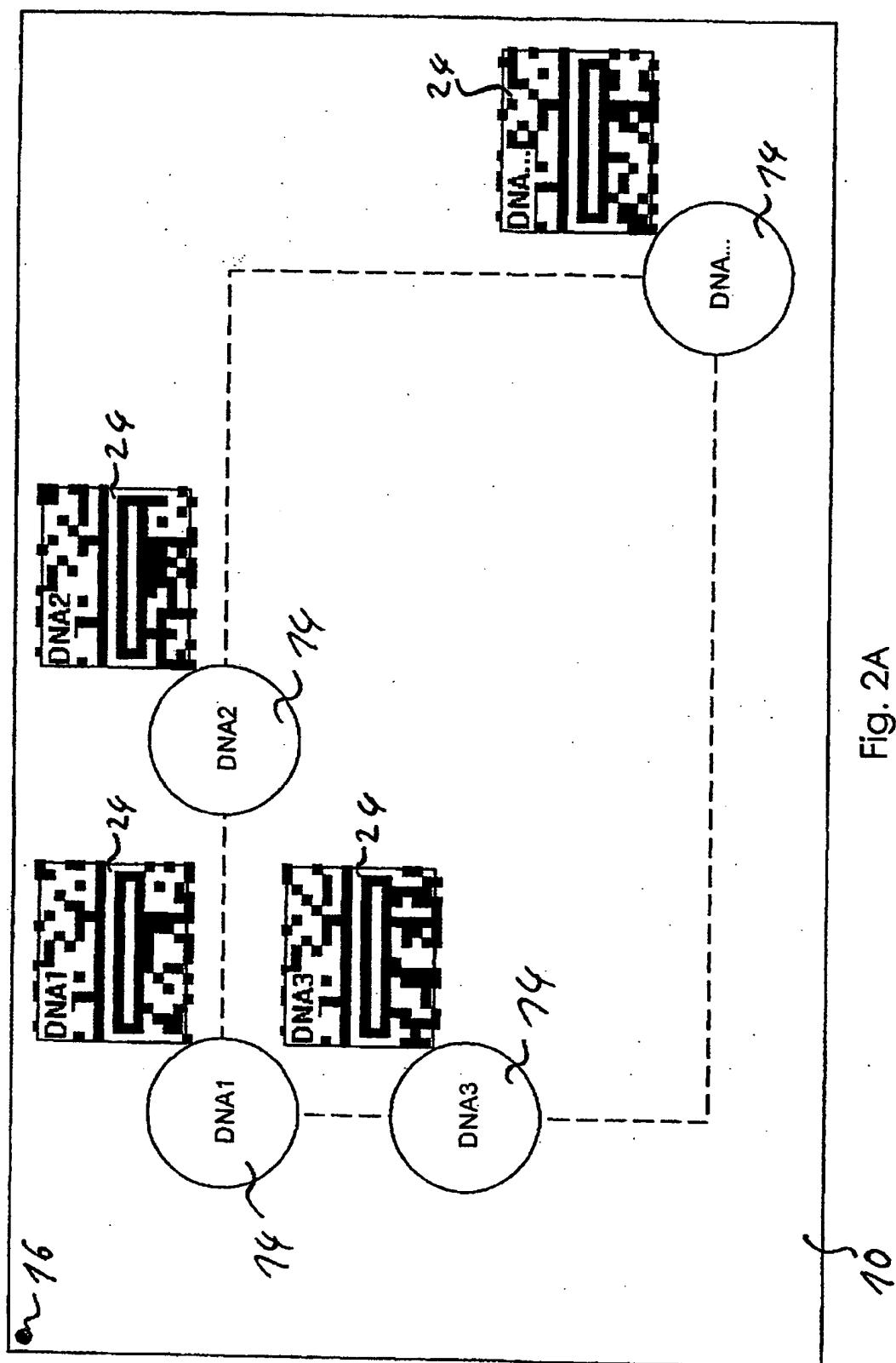


Fig. 2A

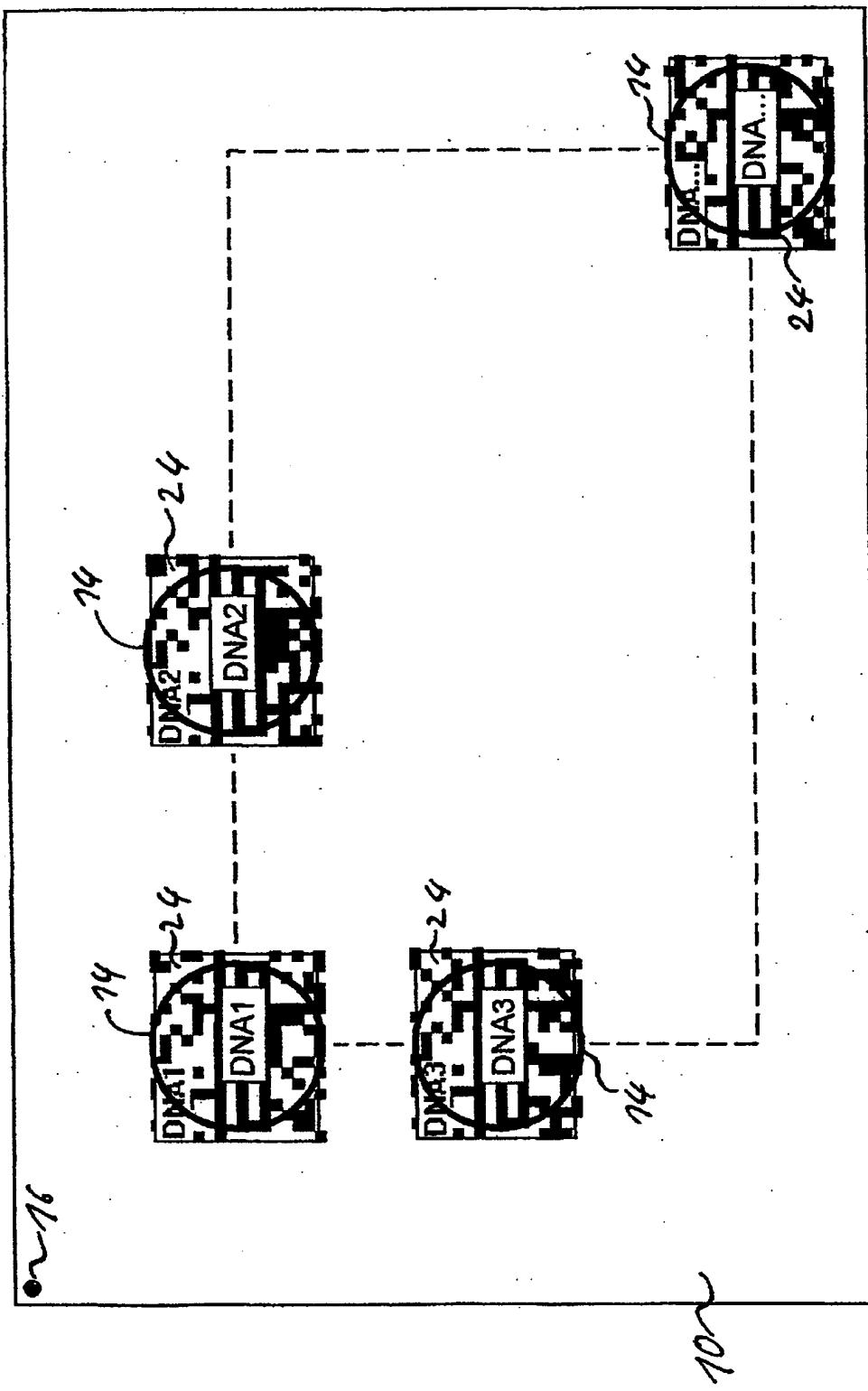


Fig. 2B

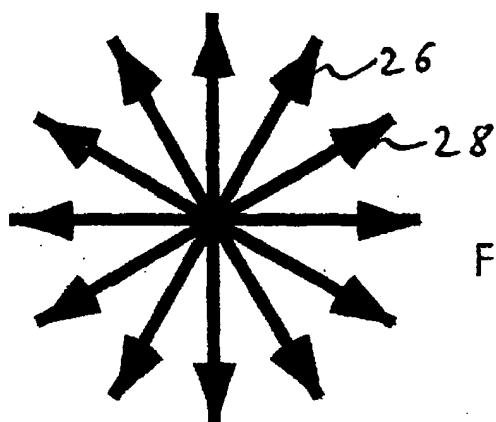


Fig. 3A

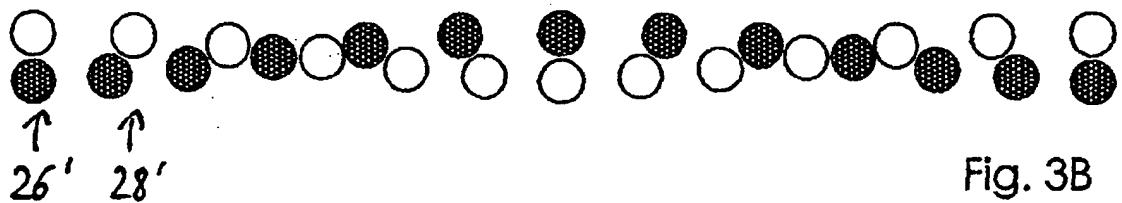


Fig. 3B

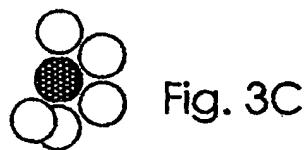


Fig. 3C

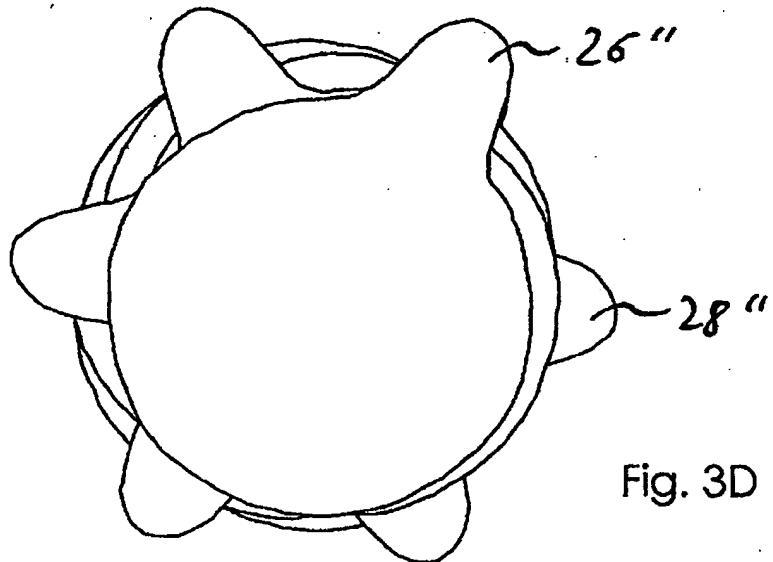


Fig. 3D

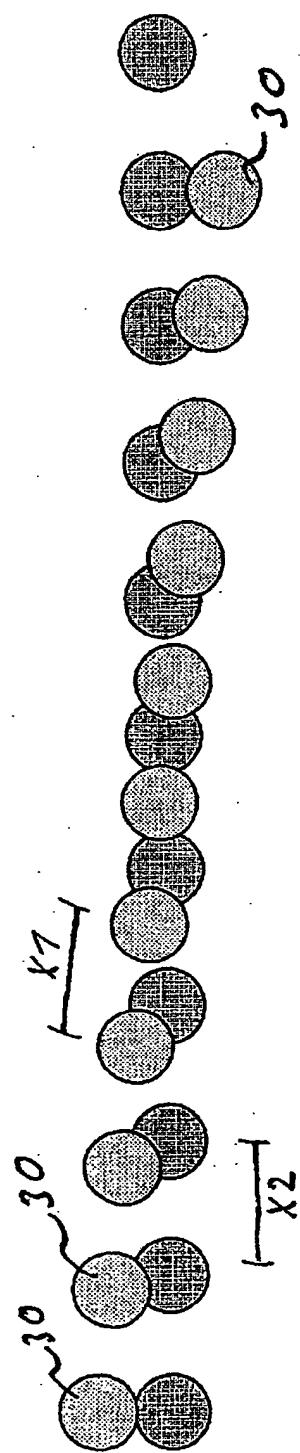


Fig. 4

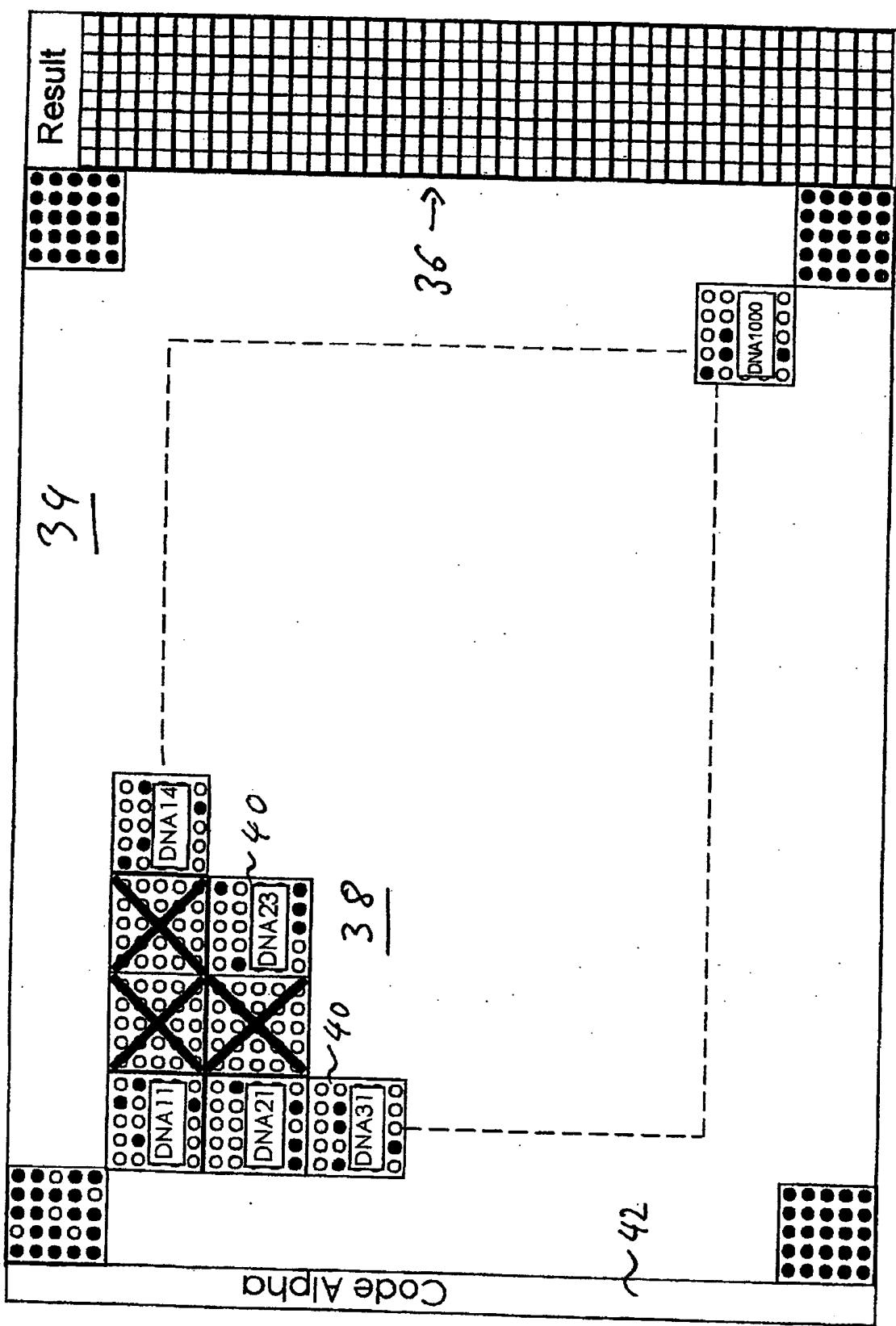


Fig. 5

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.